分子量約 1000 万の巨大粒子 vault の X 線結晶構造解析

大阪大学蛋白質研究所 田中秀明, 加藤公児, 山下栄樹

Hideaki TANAKA, Koji KATO and Eiki YAMASHITA: X-ray Crystal Structure of the Vault, Largest Ribonucleoprotein Particle, with a Molecular Weight of 10 MDa

Vaults are among the largest cytoplasmic ribonucleoprotein particles and are found in numerous eukaryotic species. Although roles in multidrug resistance and innate immunity have been suggested, the cellular function remains unclear. We have determined the X-ray structure of rat liver vault at 3.5 Å resolution. A vault particle shell was composed of 78 MVP (Major vault protein) chains with 39-fold dihedral symmetry. The shoulder domain of MVP is structurally similar to SPFH (stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C) domain involved in lipid raft association.

1. はじめに

1986年, 米国UCLAのL. H. Romeらの研究グループは, 被覆小胞に結合する巨大な粒子を発見し, その形が教会などに見られるアーチ形天井に似ていることから vault と名付けた(図1)。ラット肝臓より単離された vault は3種類のタンパク質 (major vault protein (MVP), vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPARP), telomerase-associated protein 1 (TEP1)) と1種類の非翻訳RNA (141塩基) によって構成されており、分子量約1000万でサイズが約400 Å × 700 Å という、ウイルスを除いて今日までに報告されている中では最大の分子量をもつ核酸-タンパク質複合体である(図2)。Vaultのクライオ電子顕微鏡モデルは、樽状の形を示し、その形からキャップ、ショルダー、ボディー、ウェストという3つのドメインに分けることができる。

粒子の発見から20年以上もの間、多くの研究者達が本

図1 ラット肝臓から抽出した vault の電子顕微鏡写真。(Negatively stained rat liver vault visualized by transmission electron microscopy.) 酢酸ウランを用いたネガティブ染色法による観察。スケールバーは1000 Åを表す。

粒子の機能解明に向けた研究に取り組み, 核-細胞質間物質輸送や多剤耐性への関与などさまざまな可能性が探られてきた。⁶⁻⁸⁾ しかし、どれも本質的な機能と言えるものではなく, vault の機能解析は長年にわたり停滞気味であった。われわれが本研究を開始した2002年の時点でも本質的な機能は明確ではなかったが、これだけ大きな粒子が生体内に無意味に存在しているわけではなく, 本粒子の全体構造決定を機能解明への突破口にしたいと考え, vault 粒子全体のX線結晶構造解析に着手した。このようなタンパク質複合体の機能解明に立体構造情報から迫る場合、ドメインに分けるなどして、断片的な構造情報を得るのが現在の主流ではあるが、「生体内に存在するそのままの形を見ることが機能解明への一番の近道である。」と考え、粒子の全体構造決定にこだわって研究を進めた。そして、研究

図2 ラット肝臓由来 vault のクライオ電子顕微鏡モデル。(Cryo-EM model of rat liver vault.) 粒子長軸が約700 Å, 胴体部分の最大径は約400 Åである。粒子の形から、キャップ、ショルダー、ボディーという3つのドメインに分けることができる。粒子中央部はウェストと呼ばれる。

図3 ラット肝臓由来 vault の結晶. (A crystal of rat liver vault.) 空間群は $C2$ で, 格子定数は $a = 702.2 \text{ \AA}$, $b = 383.8 \text{ \AA}$, $c = 598.5 \text{ \AA}$, $\beta = 124.7^\circ$ であった. 回折実験の際の凍結条件を最適化することで, SPring-8 の生体超分子専用ビームライン BL44XU において $3.5 \text{ \AA}$ 分解以上の反射を示した. スケールバーは 0.1 mm を表している.

開始から約6年の歳月を要したが, 2008年8月に $3.5 \text{ \AA}$ 分解能で vault 外殻の全立体構造を決定することに成功した. 9) 粒子の全体構造は, これまでのタンパク質にはない非常に特徴的な形をしており, 生物が造り上げた芸術作品とも言えるものであった. 本稿では, vault の構造決定において大きなブレイクスルーとなった回折強度データの収集方法と粒子回転対称の決定方法を中心に述べる.

2. 試料調製および結晶化

Vault の試料調製は粒子の発見者である L. H. Rome らの方法を用い, 3段階の密度勾配遠心分離によって調製した.¹⁰⁾ 2 kg のラット肝臓から約 8 mg の高純度な試料を得ることができた. 最初の微結晶は, 研究を開始して間もなく得られ, 結晶化条件の最適化を行うことにより, 2002年12月には非常にきれいな単結晶を得ることに成功した. この結晶を用い, SPring-8 の生体超分子専用ビームライン BL44XU において, 初めての回折像を得た. 回折強度データの分解能は非常に低く, $15 \text{ \AA}$ 分解能程度であったが, 分子量約 1000 万の巨大粒子の全体構造を X 線結晶構造解析によって決定できる見通しが立った. その後, われわれは高分解能の回折強度データが得られる良質結晶の作製のため, 結晶化条件のスクリーニングを行った. 研究開始から約5年間, 試行錯誤を繰り返して6種類の結晶を得た. そのうちの1つである空間群 $C2$ の結晶は, 凍結条件を最適化することで, SPring-8 の生体超分子専用ビームライン BL44XU において $3.5 \text{ \AA}$ 分解能以上の回折点を示す良質の結晶であった (図3).

3. 凍結条件の最適化

最適な抗凍結剤の選択は, 回折強度データの質を大幅に向上させるが, 誤った選択は結晶に致命的なダメージを与えてしまい, 回折点が割れたり, まったく得られなくなる

図4 抗凍結剤の浸透方法. (Stepwise soaking of cryoprotectant) 結晶を $100 \mu\text{l}$ の母液中に取り出した後, $50 \mu\text{l}$ の母液を取り除く. 次に母液よりも 1% 濃い抗凍結剤を $50 \mu\text{l}$ 加えて, 5分間浸透させる. その後, 同じ作業を繰り返すことで抗凍結剤濃度をゆっくりと上昇させる.

こともある. 特に vault のような巨大な複合体の結晶は回折強度が非常に弱く, 物理的ダメージの影響も受けやすい. よって, 初めからクライオ条件下で回折実験をすると, 誤った抗凍結剤の選択によって良い結晶をみすみす見逃してしまうことになりかねない. したがって, われわれはどの結晶においても, まず結晶をキャピラリーに詰めて, 常温での回折実験において回折点の有無やスポットの形をチェックし, 凍結や抗凍結剤の影響を受ける前の結晶の状態を確認した. 抗凍結剤の探索には, 一般的によく用いられるグリセロールやエチレングリコール, ささまざまな分子量のポリエチレングリコール (PEG) などに加えて糖類, オイルなど, あらゆるものを試した. その結果, PEG400 が最適な抗凍結剤であることがわかったのだが, 良い回折強度データが得られる再現性が低いという問題点があった. 抗凍結剤として使用した PEG400 の濃度は 34% (w/v) で, 当初は結晶を 34% (w/v) PEG400 を含んだ溶液に直接浸透させていた. われわれは, 急激な抗凍結剤濃度の上昇が結晶にダメージを与えているのであろうと考え, PEG400 の濃度を 5分おきに少しずつ上昇させて結晶への物理的ダメージを極力減らす方法を試みた (図4). その結果, 再現性良く高分解能の回折強度データを得ることが可能になった. また, 結晶を最終濃度の抗凍結剤中に一晚浸透することで, 結晶間の同型性を高めることにも成功した. これらの手法の確立により, 高分解能の回折強度データ収集は飛躍的に進んだ.

4. 多数の同型結晶を用いた回折強度データ収集

すべての回折強度データ収集は SPring-8 の BL44XU にて行った。通常のタンパク質結晶の回折実験では、数秒の露光で十分であるが、vault のように巨大な粒子の結晶は回折強度が非常に弱いため、高分解能のデータを得るためには長時間露光を行う必要があった。実際、われわれが回折強度データ収集に用いた結晶でも 5 秒露光では 8 Å 分解能程度の回折点しか得ることができなかったが、露光時間を 30 ~ 60 秒に延ばすことで最高 3.2 Å 分解能の回折点を得ることができた。しかし、当然のことながら長時間露光によって結晶が受けるダメージは大きく、1 カ所当たり 5 枚程度しかデータ収集することができなかった。したがって、高分解能回折強度データは長時間露光で、複数の同型結晶を用いて収集することにした。まず、結晶の同型性を確認するためのリファレンスとして、1 つの結晶で 8 Å 分解能程度の低分解能のフルセットデータを収集した。長時間露光によるデータ収集では、振動角 0.2 度で 1 カ所につき 5 枚の回折強度データを収集した。ビームサイズが 50 μm $\times$ 50 μm 、結晶の長軸方向のサイズが約 0.7 mm であったので、1 つの結晶から約 10 度分のデータが収集できた。最終的には 39 個の同型結晶を用いて 3.5 Å 分解能のネイティブデータを得ることができた。分解能が低いことや、同型性がないなどの理由でデータ収集に使えなかった結晶も含めると、1 つのネイティブデータセットを収集するのに使用した結晶の数は数百個以上にのぼる非常に過酷かつ地道な作業であった。

5. 構造解析

5.1 構造解析手法と粒子の回転対称

Vault の構造解析は、クライオ電子顕微鏡モデルを用いた分子置換と非結晶学的対称 (NCS : Non Crystallographic Symmetry) による電子密度の平均化によって進めた (図 5)。結晶格子内での粒子の配向は、自己回転関数を計算することで決定することができる。あとは正しい回転対称で電子密度を平均化しながら位相拡張すればよい。Vault の長軸方向の回転対称については、粒子の発見者である L. H. Rome らの 8 回回転対称という説が長年にわたって信じられてきた。¹¹⁾ 彼らは、粒子の発見当初、電子顕微鏡観察によりポリリジンでコートしたグリッド上で花びらのように開いた状態の vault (open vault) を観察した。そして、彼らが花弁の数を 8 枚と数えて以来、vault の回転対称は 8 回回転対称であると論じられてきた。2004 年にはこうした見解に基づいてクライオ電子顕微鏡での研究により、粒子の回転対称は 48 回回転対称であり、vault の外殻は 96 個の MVP で形成されると報告され、それが定説となっていた。¹²⁾ われわれも最初はその説に従って、8 回や 48 回回転対称で電子密度を平均化しながら位相拡張を行った。しか

(A)

(B)

図 5 Vault の構造解析手法。(Structure determination process of rat liver vault.) (A) 結晶格子内に配置したクライオ電顕モデル (half vault)。粒子長軸にある N 回回転対称軸の傾きは自己回転関数により決定した。(B) 分子置換法と非結晶学的対称を用いた平均化による vault の構造解析の流れ。

し、得られた電子密度は非常に乱れており、とてもモデル構築できるものではなかった。したがって、われわれは電子密度を平均化する際の回転対称の数を 7, 6, 5, ... と減らして電子密度の平均化を試みた。すると、3 回回転対称での平均で非常に明瞭な電子密度を得ることができた (図 6)。4 Å 分解能での電子密度では、キャップドメインに α -ヘリックスを示す長い筒状の電子密度が確認でき、ボディードメインには繰り返し構造を示す電子密度を確認することができた。この 3 という数字も 48 の約数であることから、粒子内部に存在するマイナー成分 (VPARP, TEP1, vRNA) の対称性が MVP に比べて低いため、8 回回

図6 3回回転対称での平均化によって得られた vault の電子密度図。(Electron density map of rat liver vault obtained from 3-fold rotational symmetry averaging.) 4 Å 分解能での電子密度図は、キャップドメインが長い α -ヘリックス、ボディドメインが繰り返し構造で構成されていることを示す。

図7 キャップドメインの電子密度の断面図。(Section of the electron density map of cap-ring domain.) キャップドメインを構成する α -ヘリックスの筒状電子密度の数は39個であることがわかる。

回転対称よりも3回回転対称での平均化のほうがよいのであろうと解釈した。しかし、キャップドメインを構成する筒状の電子密度の数を数えて非常に驚いた。何度数え直しても、その数は48本ではなく39本なのである(図7)。これまでの経験や勝手な先入観から、「生物において、39なんていう中途半端な数字があり得るのだろうか?」と少し悩みもしたが、電子密度をじっくり見ていくことで不安が自信へと変わっていくのにそれほど時間は必要ではなかった。

5.2 粒子回転対称の決定

上記のとおり、3回回転対称での電子密度の平均化は電子密度の質を劇的に向上させた。しかし、vault のもつ回転対称が3回や39回回転対称であることの正当性を立証する必要があった。よって、われわれは粒子の長軸方向に

図8 F_o と F_c の間の R 因子と相関係数の比較による粒子回転対称の検索結果。(R-factors and correlation coefficients plotted against various NCS averaging values at 10 Å resolution.) R 因子と相関係数ともに、3, 13, 39回回転対称で顕著な差が見られる。これにより、vault 粒子は3, 13, 39回回転対称をもつことが証明された。

2~48回まですべての回転対称を仮定してNCS平均化を行い、30 Å 分解能から10 Å 分解能まで位相拡張した。そして、観測された構造因子 F_{obs} と各回転対称で平均した電子密度から計算された構造因子 F_{calc} との間の R 因子と相関係数 (C.C.: Correlation Coefficient) を比較した。正しい回転対称では、ほかに比べて R 因子は小さくなり、C.C. は大きくなるはずである。その結果は非常に明瞭で、この手法による回転対称の探索により、vault が3, 13, 39回回転対称をもつことをはっきりと証明することができた(図8)。¹³⁾ Vault の外殻は、39個のMVPが集まってできたお椀型の half vault 2つが2回対称の関係で会合することにより、全部で78個のMVPで構成されるということが示され、これまでの定説を覆した。この正しい回転対称の決定が vault の構造決定の大きなブレイクスルーとなった。

5.3 3回回転対称での平均化と位相拡張

粒子の回転対称が3, 13, 39回回転対称であるのであれば、最も対称性の高い39回回転対称で電子密度を平均化することが最善の方法であるが、われわれが得た結晶中の vault 粒子は、パッキングの影響で粒子が所々歪んでいた。よって、39回対称で平均化すると電子密度が乱れてしまい、良い電子密度を得ることができなかった。したがって、まずは対称性の最も低い3回回転対称でNCS平均化を行いながら3.5 Å 分解能まで位相拡張し、得られた電子密度をもとにモデル構築を行った。

5.4 擬似39回回転対称での平均化と位相拡張

3回回転対称でのNCS平均化によって得られた電子密度にモデルを構築していくと、vault の外殻を構成するMVPは全部で12個の構造ドメインで構成されていることが明らかになった。したがって、キャップの長い α -ヘリックス部分をさらに2つに分けて合計13個の構造ドメ

図9 Vault 外殻の全体構造。(Whole structure of the vault shell.) Vault の外殻は全部で 78 個の MVP によって形成されている。縦長の特徴的な構造をもつ MVP が 39 個集まってお椀型の半分の vault を形成し、それらが N 末端同士で 2 回対称の関係で会合することにより、鳥かご状の構造が形成される。

インに分類した。そして、原子座標に基づき各ドメインについて 39 個の NCS マトリクスを計算した。得られた 507 個 (13 × 39) の NCS マトリクスを用いてドメインごとに NCS 平均化をしながら、6.0 Å 分解能から 3.5 Å 分解能まで位相拡張を行った。この際、各 NCS マトリクスは位相拡張のたびに精密化した。この擬似 39 回回転対称を用いた電子密度の平均化により、電子密度は大幅に改善され、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなど、かさ高い側鎖の電子密度が明瞭になった。

6. 全体構造

Vault 外殻の全体構造は 78 個の MVP で形成される (図 9)。39 個の MVP が環状に並ぶことによってお椀型の半分の vault が形成され、それらが N 末端同士で 2 回対称の関係で会合し、鳥かご状の構造を形成している。すなわち、78 個の MVP が D_{39} の対称をもった樽状の構造を形成している。粒子長軸の長さは約 670 Å、胴体部分の最大径は約 400 Å であった。粒子外殻は全体的に非常に薄く、厚さは 15 ~ 30 Å 程度であり、粒子内部は大きな空洞になっていた。これまでに X 線結晶構造解析により構造決定された最大の細胞内小器官は 分子量約 250 万の 70S リボソームであったが、vault 粒子は内部の空洞にリボソームを 2, 3 個入れることができるほど大きい。

7. MVP モノマーの構造

MVP モノマーは縦に長く伸びた非常に珍しい構造である (図 10)。ボディードメインは、逆平行 β シートで形成される 9 つの繰り返し構造 (アミノ酸残基 1-519) からなり、 α/β 球状ドメインで形成されるショルダードメイン (アミ

図 10 MVP モノマーの立体構造。(Monomer structure of MVP.) Vault 外殻の構成成分である MVP は縦長の特徴的な形をしており、12 個の構造ドメインに分けることができる。

図 11 ショルダードメインと SPFH ドメイン。(The structure comparison of MVP shoulder domain with SPFH domain.) MVP のショルダードメインはアミノ酸相同性が低いにもかかわらず、脂質ラフトへの結合に重要な SPFH ドメインと類似の構造をもつ。(PhSto^{CD} : Core domain of stomatin from *Pyrococcus horikoshii* (PDB 3BK6), Flot^{BD7} : Flotillin-2 band-7 domain (PDB 1WIN))

ノ酸残基 520-646)、42 ターンの α -ヘリックスで形成されるキャップヘリックスドメイン (アミノ酸残基 647-802)、キャップドメインの頂上で U 字型の構造を形成するキャッピングドメイン (アミノ酸残基 803-845) の計 12 個のドメインからなる。

8. MVP ショルダードメインの構造類似性

われわれは、得られた MVP の各ドメイン構造について、

DALI サーバー¹⁴⁾を用いた構造類似性の検索を行った。その結果、シオルダードメインは、脂質ラフトへの結合に重要であるとされる SPFH (stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C) ドメイン¹⁵⁾⁻¹⁷⁾と類似の構造をもつことが明らかになり(図 11)、立体構造情報から vault が脂質ラフトに結合する可能性が示された。

9. おわりに

幅広い真核生物がもつ vault は、粒子の発見から 20 年以上もの間、謎に満ちた細胞内小器官であった。われわれは、分子量が 1000 万を超える vault を生体内に存在するそのままの状態で結晶化することに成功し、粒子の全体構造決定を目指した研究を進めた。構造決定においては、独自の方法による粒子の正確な回転対称の決定が大きなブレイクスルーになった。われわれが 3.5 Å 分解能で決定した粒子の全体構造から vault の脂質ラフトへの結合の可能性を示すことができた。この結果は、vault の自然免疫反応への関与を示す M. P. Kowalski らの報告とも一致しており、¹⁸⁾ 立体構造情報から vault の機能解明に向けた 1 つの方向性を示すことができた。

謝 辞

本研究は大阪大学蛋白質研究所、月原富武教授(現 兵庫県立大学ピコバイオロジー研究所教授)の指導のもと、多くの方々とともに進めてきました。試料の調製においては、産業医科大学の住澤知之博士にご助言、ご協力いただきました。位相決定に重要であった電子顕微鏡の単粒子解析においては、大阪大学蛋白質研究所の岩崎憲治准教授、SPRING-8 の生体超分子専用ビームライン BL44XU におけるデータ収集や構造解析においては、吉村政人博士(現 SPRING-8・台湾ビームライン)に大変お世話になりました。また、プログラム Lafire を用いたモデル構築と構造の精密化におきましては、北海道大学理学部の姚 関准教授と周 勇博士に大変お世話になりました。この場をお借りしましてお礼申し上げます。

文 献

- 1) N. L. Kedersha and L. H. Rome: *J. Cell Biol.* **103**, 699 (1986).
- 2) A. G. Stephen, S. Raval-Fernandes, T. Huynh, M. Torres, V. A. Kickhoefer and L. H. Rome: *J. Biol. Chem.* **276**, 23217 (2001).
- 3) V. A. Kickhoefer, A. C. Siva, N. L. Kedersha, E. M. Inman, C. Ruland, M. Streuli and L. H. Rome: *J. Cell Biol.* **146**, 917 (1999).
- 4) V. A. Kickhoefer, A. G. Stephen, L. Harrington, M. O. Robinson and L. H. Rome: *J. Biol. Chem.* **274**, 32712 (1999).
- 5) V. A. Kickhoefer, R. P. Searles, N. L. Kedersha, M. E. Garber, D. L. Johnson and L. H. Rome: *J. Biol. Chem.* **268**, 7868 (1993).
- 6) G. L. Scheffer, P. L. Wijngaard, M. J. Flens, M. A. Izquierdo, M. L. Slovak, H. M. Pinedo, C. J. Meijer, H. C. Clevers and R. J. Scheper: *Nature Med.* **1**, 578 (1995).
- 7) G. L. Scheffer, A. B. Schroeijers, M. A. Izquierdo, E. A. Wiemer and R. J. Scheper: *Curr. Opin. Oncol.* **12**, 550 (2000).

- 8) S. C. Gopinath, A. Matsugami, M. Katahira and P. K. Kumar: *Nucleic Acids Res.* **33**, 4874 (2005).
- 9) H. Tanaka, K. Kato, E. Yamashita, T. Sumizawa, Y. Zhou, M. Yao, K. Iwasaki, M. Yoshimura and T. Tsukihara: *Science* **323**, 384 (2009).
- 10) L. B. Kong, A. C. Siva, L. H. Rome and P. L. Stewart: *Structure* **7**, 371 (1999).
- 11) N. L. Kedersha, J. E. Heuser, D. C. Chugani and L. H. Rome: *J. Cell Biol.* **112**, 225 (1991).
- 12) Y. Mityas, M. Makabi, S. Raval-Fernandes, L. Harrington, V. A. Kickhoefer, L. H. Rome and P. L. Stewart: *J. Mol. Biol.* **344**, 91 (2004).
- 13) K. Kato, H. Tanaka, T. Sumizawa, M. Yoshimura, E. Yamashita, K. Iwasaki and T. Tsukihara: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **64**, 525 (2008).
- 14) L. Holm and C. Sander: *Science* **273**, 595 (1996).
- 15) H. Yokoyama, S. Fujii and I. Matsui: *J. Mol. Biol.* **376**, 868 (2008).
- 16) N. Tavernarakis, M. Driscoll and N. C. Kyrpides: *Trends Biochem. Sci.* **24**, 425 (1999).
- 17) E. Umlauf, E. Csaszar, M. Moertelmaier, G. J. Schuetz, R. G. Parton and R. Prohaska: *J. Biol. Chem.* **279**, 23699 (2004).
- 18) M. P. Kowalski, A. Dubouix-Bourandy, M. Bajmoczy, D. E. Golan, T. Zaidi, Y. S. Coutinho-Sledge, M. P. Gygi, S. P. Gygi, E. A. Wiemer and G. B. Pier: *Science* **317**, 130 (2007).

プロフィール

田中秀明 Hideaki TANAKA
大阪大学蛋白質研究所
Institute for Protein Research, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
3-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: tana@protein.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科博士後期課程 2000 年 3 月単位取得退学、博士(理学)
専門分野：タンパク質結晶学
現在の研究テーマ：分子量数百万以上の生体超分子複合体の構造と機能の解明

加藤公児 Koji KATO
大阪大学蛋白質研究所
Institute for Protein Research, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
3-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: k-kato@protein.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士後期課程 2006 年 3 月単位取得退学、博士(理学)
専門分野：タンパク質結晶学
現在の研究テーマ：分子量数百万以上の生体超分子複合体の構造と機能の解明

山下栄樹 Eiki YAMASHITA
大阪大学蛋白質研究所
Institute for Protein Research, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
3-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: eiki@protein.osaka-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士後期課程 1997 年 3 月修了、博士(理学)
専門分野：タンパク質結晶学
現在の研究テーマ：膜タンパク質および分子量数百万以上の生体超分子複合体の構造と機能の解明
日本結晶学会誌 第 51 巻 第 3 号 (2009)